

非小細胞肺癌患者における XAGE-1b (GAGED2a) に対する 宿主免疫応答の解析

大植 祥弘

川崎医科大学呼吸器内科学, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 本邦での死因の第一位は悪性新生物となり, 新規のがん診断と治療法の開発が急務である. 近年, 新しい治療法として免疫療法が注目され, 免疫原性の高いがん特異抗原を用いたワクチン療法が試みられている. がん精巣 (CT, cancer/testis) 抗原は, その発現が精巣とがん組織に限定されていることからワクチン療法の標的抗原として有望視されている. 本研究では, 非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者で CT 抗原のひとつである XAGE-1b (GAGED2a) に対する宿主免疫応答について検討した.

液性免疫については, 2005年から2011年に, 川崎医科大学附属病院を受診した肺癌患者407例 (小細胞肺癌: SCLC 45例, 非小細胞肺癌: NSCLC 362例), および対照群として健常人50例を対象として検討した. 抗体の検出は XAGE-1b 合成タンパクを用い ELISA 法で測定した. また細胞性免疫については, 血清抗体価陽性症例 KLU187, 陰性症例 KLU37の末梢血単核球 (PBMC) より単離した CD4 T 細胞, CD8 T 細胞を用いて XAGE-1b 抗原と抗原提示細胞, T 細胞を共培養することによって抗原特異的 T 細胞の誘導を検討した. XAGE-1b 特異的 CD4 と CD8 T 細胞の検出は IFN γ ELISA 法または IFN γ 分泌アッセイ法で解析した.

XAGE-1b (GAGED2a) 抗体は全肺癌で32/407例 (7.9%), SCLC の0/45 (0.0%), NSCLC の32/362例 (8.8%) に認め, NSCLC の中でも, 肺腺癌28/220 (12.7%) に多く認めた. さらに臨床病期3B/4の肺腺癌に於いては22/118例 (18.6%) と高率に特異抗体を検出した. 一方, 抗体陽性患者の CD4, CD8 T 細胞については, XAGE-1b (GAGED2a) に対する特異的な反応を検出した.

これまでに, がん免疫療法の標的抗原として種々の CT 抗原が同定されてきた. いくつかの CT 抗原は肺癌にも高頻度に発現する. しかし, 液性免疫反応を誘導するものはほとんどない. 今回, NSCLC 患者において, XAGE-1b (GAGED2a) に対する特異的な液性免疫応答を高率に検出した. さらに, 抗体陽性患者に, 細胞性免疫も検出した. これらの知見は, XAGE-1b (GAGED2a) を用いた肺癌ワクチン療法が有望であることを示唆している.

(平成23年10月24日受理)

キーワード: がん精巣抗原, XAGE-1b (GAGED2a), 非小細胞肺癌, がん免疫

緒言

近年, 新しいがん治療法として免疫療法が注目され, 次世代の治療法として免疫原性の高い

がん特異抗原を用いたワクチン療法や特異的抗体療法が試みられている¹⁻³⁾. がん特異抗原の一つであるがん精巣 (CT, cancer/testis) 抗原

別刷請求先
大植 祥弘
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学呼吸器内科

電話: 086 (462) 1111
ファックス: 086 (464) 1041
Eメール: poohsan@med.kawasaki-m.ac.jp

は、その発現が精巣とがん組織に限定されていることからワクチン療法の標的抗原として有望視されている^{4, 5)}。

XAGE-1 は *PAGE/GAGE* 関連遺伝子として報告され⁶⁾、肺癌患者の血清を用いた SEREX 法により同定された CT 抗原である^{7, 8)}。これまでに *XAGE1A-E* の 5 種類の遺伝子が同定され、その関連蛋白は GAGED2 であり、GAGED2a と GAGED2d の二種類のアイソフォームが存在する⁷⁾。また、筆者らを含めて多くの研究者により *XAGE-1a,b,c,d* の 4 種類のバリエーションが同定されているが、この中でも *XAGE-1b*(GAGED2a) は、肺癌、肝臓癌、前立腺癌細胞株で高頻度に mRNA の発現を認め、モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色では主に肺腺癌に発現することが報告されている⁹⁻¹³⁾。さらに非小細胞肺癌患者での外科的肺切除標本における MHC class I と *XAGE-1b* (GAGED2a) の発現と予後との解析では、*XAGE-1b* (GAGED2a) と MHC class I の両方の発現は予後と密接に関係することも明らかにした¹⁴⁾。本研究では、肺癌患者での *XAGE-1b* 抗原に対する宿主免疫応答を解析した結果、進行期非小細胞肺癌、特に進行期肺腺癌で高率に液性免疫の誘導が確認され、血清抗体価陽性患者より抗原特異的な T 細胞の誘導にも成功した。これらのことは、*XAGE-1b* (GAGED2a) を標的としたがんワクチン療法が、非小細胞肺癌 (NSCLC) で有望であることを示唆している。

材料と方法

患者血清および末梢血単核球

2005年から2011年、川崎医科大学附属病院を受診した肺癌患者407例（小細胞肺癌45例、非小細胞肺癌362例）および対照群として健常人50例を対象とした。血清抗体価陽性患者の末梢血から比重遠心法によって単核球分画を得、磁気細胞分離法 (MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて、順次 CD8、CD4陽性分画および CD4⁺CD8⁻ 分画を分離した。本研究は、川崎医科大学倫理委員会に

承認を受け、検体は十分なインフォームド・コンセントの上、書面にて同意を得た症例からのみ採取した。

XAGE-1b (GAGED2a) 蛋白およびペプチド

XAGE-1b (GAGED2a) (81個アミノ酸) 合成蛋白は GL バイオケム社 (上海, 中国) で合成されたものを使用した。*XAGE-1b*(GAGED2a) 全長をカバーする16あるいは17塩基のオーバーラップペプチド (OLPs), 1-16, 5-20, 9-24, 13-28, 17-32, 21-36, 25-40, 29-44, 33-48, 37-52, 41-56, 45-60, 45-60, 49-64, 53-68, 57-72, 61-76, 65-81は Fmoc 固相法でマルチペプチド合成機 (AMS422: ABIMED, Langenfeld, Germany) を用いて岡山大学医学部共同実験室で合成した。NY-ESO-1リコンビナント蛋白は当教室で合成精製したものを使用した¹⁵⁾。

ELISA 法

XAGE-1b (GAGED2a) 合成蛋白または NY-ESO-1リコンビナント蛋白 $1 \mu\text{g/ml}$ (炭酸バッファー, pH9.6) を 4°C オーバーナイトで96穴プレート (Nalge Nunc International, Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY) にコートした後、洗浄液 (PBS/0.1% TWEEN) で洗浄し、5%FCS/PBS で 37°C 1時間ブロックした。ブロック終了後、300倍に希釈した血清を *XAGE-1b* (GAGED2a) は 4°C で、NY-ESO-1は 37°C で2時間反応させた。つづいて洗浄液で洗浄後、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (x 5,000) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) を加え、 37°C で1時間反させた。反応終了後、洗浄し、過酸化水素を加えた基質溶液 (オルトフェニレンジアミンを 0.05M クエン酸バッファー pH5.0 に溶かした溶液) を加えて発色させた。発光後、硫酸 (6N) で反応を停止しマイクロプレートリーダー (Bio-Ras Laboratories, Tokyo, Japan) を用いて吸光度 (波長490nm) を測定した。

XAGE-1b (GAGED2a) 特異的 CD4 T 細胞およ

び CD8 T 細胞の誘導

血清抗体価陽性患者より採取分離した CD4 T 細胞 2×10^6 個/穴, CD8 T 細胞は, 1×10^4 個/穴を, それぞれ同数の X 線照射 (40Gy) CD4⁺CD8⁻ T 細胞を抗原提示細胞として用い, XAGE-1b (GAGED2a) OLPs $1 \mu\text{M}$ 存在下に, CD4 T 細胞は24穴プレート, CD8 T 細胞は96穴プレートで10-14日間 CO₂インキュベーター内で刺激培養を行った. 培地は, 5% プール血清 / AIM-V, IL-2 10 IU/ml , IL-7 10 ng/ml でおこなった.

IFN γ 産生細胞の検出

XAGE-1b (GAGED2a) 特異的 CD4 と CD8 T 細胞の検出は IFN γ ELISA 法または IFN γ 分泌アッセイ法で解析した. 刺激培養後の細胞 1×10^4 個 (IFN γ ELISA) または 5×10^4 個 (IFN γ 分泌アッセイ法) を同数の XAGE-1b (GAGED2a) OLPs でパルスまたは非パルスした自己 Epstein-Barr Virus (EBV-B) 細胞で 37°C 4 時間 (CD4 T 細胞) または 8 時間 (CD8 T 細胞)

胞) CO₂インキュベーターで反応させ, ヒト IFN γ キャッチ抗体 (Miltenyi Biotec GmbH) $2 \mu\text{l}$ を用いて培養細胞を標識した. その後, 10 ml の AIM-V 培地に懸濁しローテーター (MACSmix™, Miltenyi Biotec GmbH) を 37°C 60分 CO₂インキュベーター内で反応させ, 洗浄後, ヒト IFN γ キャッチ検出抗体 $2 \mu\text{l}$, 抗ヒト CD4-FITC または抗ヒト CD8-FITC $1 \mu\text{l}$ を加えて染色した. 染色後, FACS バッファー (1% FCS/PBS, 0.02% アジ化ナトリウム) を加えて洗浄し, FACS Cant II (Bioscience, San Jose, CA) を用いて IFN γ 産生細胞を検出した.

刺激培養で用いた培養上清は, IFN γ サンドイッチ ELISA 法で抗原特異的な T 細胞による IFN γ 産生の検出をおこなった.

結 果

XAGE-1b (GAGED2a) および NY-ESO-1 蛋白に対する抗体反応

XAGE-1b (GAGED2a) に対する液性免疫応

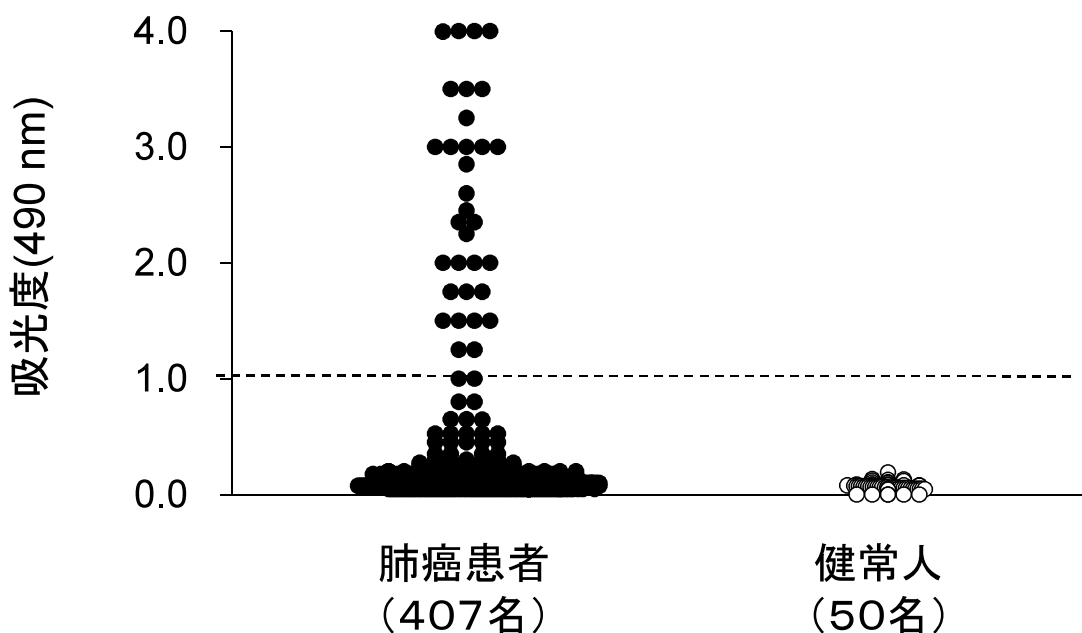


図1 肺癌患者および健常人における XAGE-1b (GAGED2a) 蛋白に対する抗体反応

肺癌患者407名の血清および健常人50名の血清を300倍希釈し, ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒト IgG 抗体 ($\times 5,000$) で検出した. 反応終了後発色し吸光度を測定した. 血清希釈倍率300倍の O.D. 値490nm が1.0以上を陽性とした. この値は, 健常人における O.D. 値の平均値 + 10 SD である.

表1 肺癌患者における XAGE-1b(GAGED2a) 抗体および NY-ESO-1抗体の頻度

組織型	人数 (%)	抗体価陽性 * 患者 (%)	
		XAGE-1b	NY-ESO-1
肺癌	407 (100)	32/407 (7.9)	23/407 (5.7)
小細胞肺癌	45 (11.1)	0	1/45 (2.2)
非小細胞肺癌	362 (89.0)	32/362 (8.8)	22/362 (6.1)
進行期非小細胞肺癌	194 (47.7)	25/194 (12.9)	17/194 (8.8)
腺癌	220 (54.8)	28/220 (12.7)	7/220 (3.2)
進行期腺癌	118 (29.0)	22/118 (18.6)	5/118 (4.2)
扁平上皮癌	85 (20.9)	1/85 (1.2)	6/85 (7.1)
進行期扁平上皮癌	42 (10.3)	1/42 (2.4)	5/42 (11.9)
大細胞癌	8 (2.0)	0	0
腺扁平上皮癌	6 (1.5)	1/6 (16.7)	1/6 (16.7)
多形癌	7 (1.7)	0	0
分類不能	36 (8.8)	2/36 (5.6)	8/36 (22.2)

* 患者血清 300 倍希釈での O.D. 値 1.0 以上を抗体価陽性とした。

答を検討するため、肺癌患者407名（小細胞肺癌45名、非小細胞肺癌362名）および健常人50名の血清中抗 XAGE-1b (GAGED2a) IgG 抗体の有無を ELISA 法で検出した（図1、表1）。XAGE-1b (GAGED2a) 特異的抗体は全肺癌で32/407例（7.9%）、小細胞肺癌の0/45（0.0%）、非小細胞肺癌の32/362例（8.8%）に認め、非小細胞肺癌では、肺腺癌28/220（12.7%）、扁平上皮癌1/85（1.2%）と、肺腺癌での検出率が高かった。さらに臨床病期3B/4の肺腺癌においては22/118例（18.6%）と、それ以外の病期の6/102（5.9%）に比し、高率に XAGE-1b (GAGED2a) 特異抗体を検出した。健常人50名においても同様の検出を行ったが、XAGE-1b (GAGED2a) に対する抗体反応は認められなかった（図1）。

NY-ESO-1はCT抗原の一つであるが、免疫原性が強く、世界各地でNY-ESO-1を標的としたがん免疫療法の臨床試験が行われている^{16, 17)}。そのNY-ESO-1抗原に対する特異的抗体は、肺癌においては23/407（5.7%）、進行期非小細胞肺癌17/194（8.8%）であった（表1）。

XAGE-1b (GAGED2a) オーバーラップペプチド (OLPs) に対する CD4およびCD8 T細胞の反応

血清抗体価陽性患者である KLU187より採取した末梢血単核球を用いて、XAGE-1b (GAGED2a) 抗原特異的な T細胞の誘導を試みた。CD4 T細胞およびCD8 T細胞をそれぞれ

同数の X線照射後の抗原提示細胞 (CD4⁺CD8⁻細胞) と XAGE-1b (GAGED2a) OLPs とともに、それぞれ14日 (CD4 T細胞) および10日間 (CD8 T細胞) の刺激培養を行った。刺激培養後の CD4 T細胞およびCD8 T細胞 2 x 10⁵ 個を同数の XAGE-1b (GAGED2a) OLPs パルスあるいは非パルスの自己 EBV-B 細胞で37℃ 4時間 (CD4 T細胞) または8時間 (CD8 T細胞) 反応させ、IFN γ 分泌アッセイを行った。その結果、XAGE-1b (GAGED2a) 抗原特異的な CD4 T細胞およびCD8 T細胞の検出に成功した（図2）。CD4 T細胞は1回の刺激培養で11.1%、2回刺激で28.0%と非常に強い IFN γ 産生細胞が検出された。CD8 T細胞も同様に、1回刺激培養で1.1%、2回刺激培養で4.3%と IFN γ 産生細胞が検出された。しかしながら、このような抗原特異的な反応は、血清抗体価陰性患者である KLU37には認めなかった。また2回の刺激培養でも同様に認められなかった（図2）。

特異抗体およびCD4, CD8 T細胞の XAGE-1b (GAGED2a) ペプチド認識領域の検討

血清抗体陽性患者 KLU187の抗体およびCD4, CD8 T細胞が認識する XAGE-1b (GAGED2a) OLPs の領域を検討した。XAGE-1b (GAGED2a) OLPs は XAGE-1b(GAGED2a) 全長をカバーするように作成したペプチドである（図3）。血清抗体が認識する XAGE-1b(GAGED2a)OLP 領域を同定するため、

XAGE-1b (GAGED2a) OLP $1 \mu\text{g/ml}$ をプレートにコートし抗体反応を ELISA 法で検出した。その結果、血清抗体は、XAGE-1b(GAGED2a) OLP の57-72を強く認識していることが分かった(図4)。同部位は、XAGE-1b (GAGED2a) 81アミノ酸配列上、相対的に親水性の高い領域である。

CD4およびCD8 T細胞が認識する XAGE-1b(GAGED2a)OLP 領域を同定するため、一回

刺激培養後の CD4およびCD8 T細胞を用いて解析した。それぞれのT細胞を各 XAGE-1b (GAGED2a) OLP $5 \mu\text{M}$ をパルスした自己 EBV-B 細胞を標的細胞として用い IFN γ 分泌アッセイをまたは IFN γ ELISA 法を行った。XAGE-1b (GAGED2a) 抗原特異的 CD4 T細胞は17-32, 21-36を、CD8 T細胞は45-60, 49-64番のアミノ酸領域を認識することが判明した(図4)。

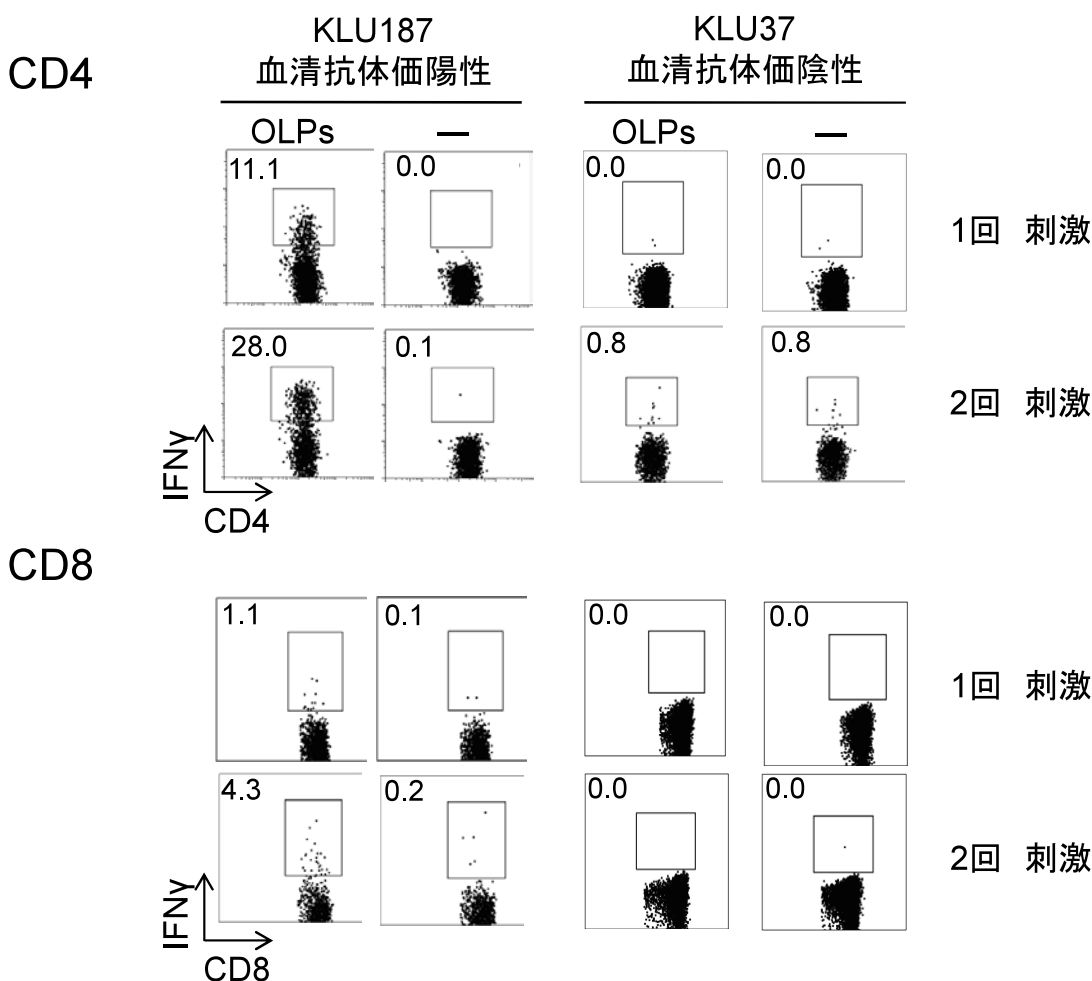


図2 XAGE-1b(GAGED2a)に対するCD4およびCD8 T細胞の反応

血清抗体価陽性患者であるKLU187, 血清抗体価陰性患者KLU37より採取した末梢血単核球を用いた。CD4 T細胞およびCD8 T細胞をそれぞれ同数のX線照射後の抗原提示細胞(CD4⁺CD8⁻細胞)とXAGE-1b (GAGED2a) OLPs $1 \mu\text{M}$ とともに、それぞれ14日(CD4 T細胞)および10日間(CD8 T細胞)の刺激培養を行った。刺激培養後のCD4 T細胞およびCD8 T細胞 2×10^5 個を同数のXAGE-1b (GAGED2a) OLPs パルスあるいは非パルスの自己EBV-B細胞で 37°C 4時間(CD4 T細胞)または8時間(CD8 T細胞)反応させ、IFN γ 分泌アッセイを行った。上段にはCD4 T細胞、下段にはCD8 T細胞の反応結果を示す。また抗原特異的の反応は、1回刺激、2回刺激と反復し検出を行った。

考 察

これまで CT 抗原の一つである NY-ESO-1 抗原を標的としたがんワクチンの臨床試験が行われ、腫瘍の縮小や増殖停止など一定の効果をあげている^{16,17)}。本研究で用いた XAGE-1b (GAGED2a) も NY-ESO-1 と同様に CT 抗原の一つであり、高い抗原性を有していると考えられる^{16,17)}。我々はこれまでに、肺癌において XAGE-1b (GAGED2a) の発現を検討し、mRNA で 45%、免疫染色で 32.5% 発現していることを報告してきた¹⁸⁾。本研究では、肺癌患者において、XAGE-1b (GAGED2a) に対する液性免疫および細胞性免疫の反応を検討した。

今回、407名の肺癌患者を対象として、血清中の XAGE-1b (GAGED2a) および NY-ESO-1 蛋白に対する抗体反応を ELISA 法で検討した結果、肺癌患者全体でみると XAGE-1b (GAGED2a) 抗体は 7.9%、NY-ESO-1 抗体は 5.7% に検出された。進行期非小細胞肺癌では XAGE-1b (GAGED2a) 抗体は 12.9% であり、進行期肺腺癌に限れば、18.6% と高率にその存在が認められた。NY-ESO-1 は食道癌患者の血清を用いて SEREX 法で同定された CT 抗原の

ひとつであるが、免疫原性が強く液性免疫と細胞性免疫を誘導することができ、がん免疫療法の標的抗原として最も注目を浴びている^{2-4,19-21)}。しかしながら、その mRNA の発現は肺癌で約 6%⁵⁾ と低く、また今回血清抗体価の検討を行った結果も 5.7% と低頻度であった。さらにその他の CT 抗原である MAGE-A3 や SSX2 は、肺癌で高頻度に mRNA の発現はみとめるものの液性免疫はほとんど認められない^{5,22-25)}。一方、がん抑制遺伝子である p53 遺伝子変異に関しても、遺伝子異常にもとづく異常蛋白に対する p53 抗体は高頻度に認められる²⁶⁾。しかし、血清抗体価陽性患者より抗原特異的 CD4 T 細胞の誘導は認められるが、CD8 T 細胞は検出されていない²⁷⁾。

今回、肺癌患者において XAGE-1b (GAGED2a) 抗体が高頻度に認められ、血清抗体価陽性患者より抗原特異的な CD4 および CD8 T 細胞を検出できた意義は大きく、XAGE-1b (GAGED2a) は NY-ESO-1 と同様に強い免疫原性を有することが示唆された。また、XAGE-1b (GAGED2a) の肺癌における発現頻度より、肺癌において XAGE-1b (GAGED2a)

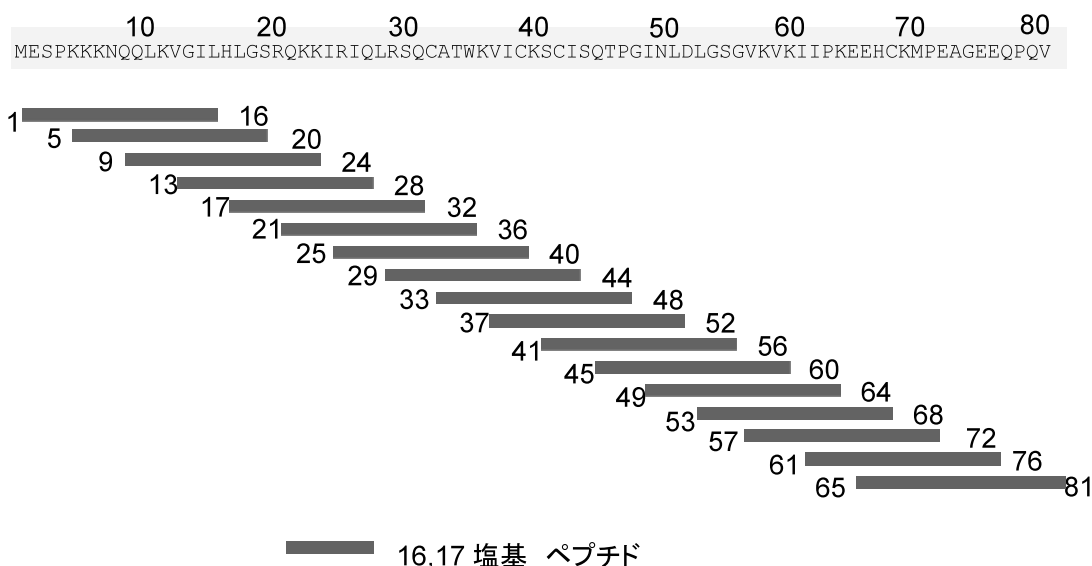


図3 XAGE-1b(GAGED2a) オーバーラップペプチド (OLPs)

XAGE-1b (GAGED2a) 全長をカバーする16あるいは17塩基のペプチド番号を示す。

を標的としたがん免疫療法が大いに期待される。

XAGE-1b (GAGED2a) は核内抗原であり、液性免疫だけではがんの縮小、治療は不可能である。そのため、XAGE-1b (GAGED2a) を標的としたがん免疫療法の開発には、XAGE-1b (GAGED2a) 免疫によってヘルパー CD4 T 細胞や細胞傷害性 CD8 T 細胞を誘導でき得る事が重要となる。また、抗腫瘍効果は細胞傷害性 CD8 T 細胞の存在が重要であるが、その細胞傷害性 T 細胞の活性化に重要な役割を果たすのが CD4 T 細胞である。がん微小環境では、免疫回避機構が存在し²⁸⁾、その影響で腫瘍細胞の一部では、MHC クラス I 分子の発現が低下し

て免疫監視機構から逸脱する場合もある。CD4 T 細胞は IFN γ などのサイトカインを産生することで腫瘍細胞の MHC クラス I 分子の発現増加や、細胞傷害性 CD8 T 細胞の細胞傷害活性の増強などの効果をもつ。このように CD4 T 細胞は、液性免疫および細胞性免疫の誘導に重要な役割を果たしている。これまでと同様に^{29, 30)} 本研究によって、XAGE-1b (GAGED2a) 抗原特異的 CD4 T 細胞の反応は 1 回刺激、2 回刺激で著明に上昇し、かつ非常に反応が強いことが判明した。この事は、XAGE-1b (GAGED2a) は非常に強い CD4 T 細胞免疫を誘導し、液性および細胞性免疫を増強していると予想できる。

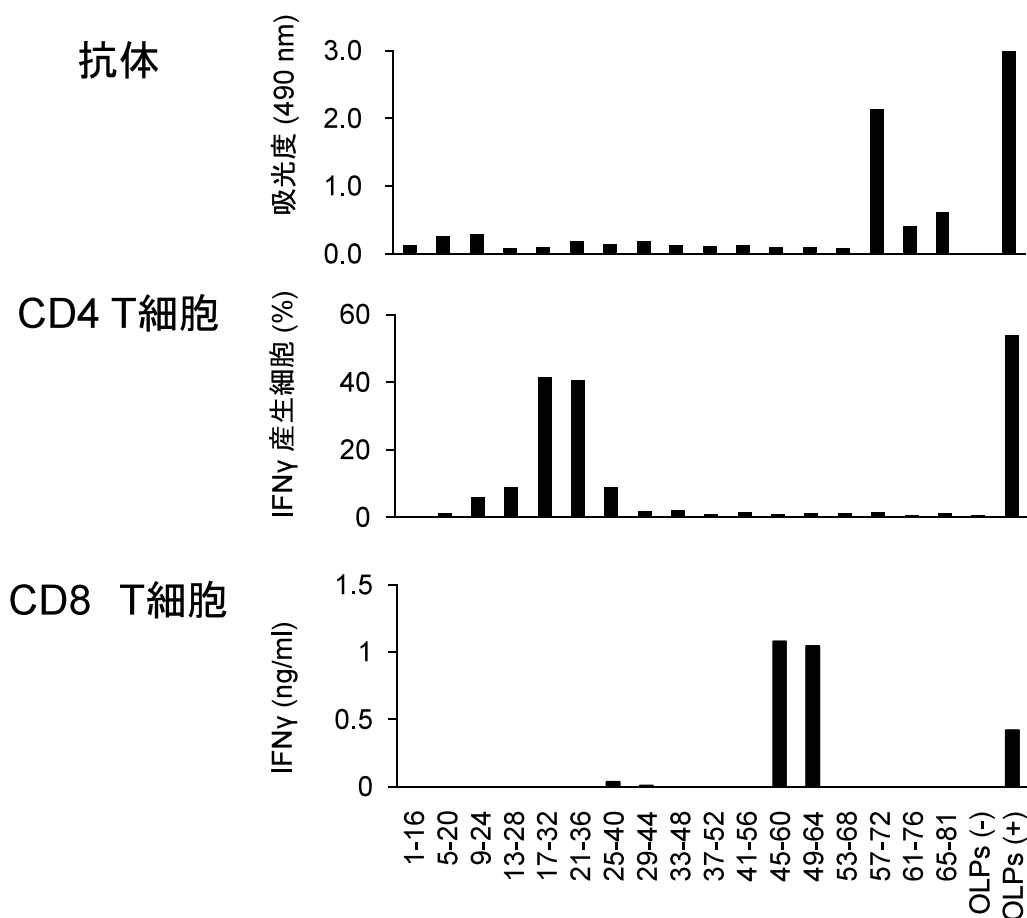


図4 抗体およびCD4, CD8 T細胞が認識するXAGE-1b (GAGED2a) OLP領域の検討

上段は血清抗体陽性患者 KLU187の抗体が認識するXAGE-1b (GAGED2a) OLP領域を示す。中段には、IFN γ 分泌アッセイで検出した同患者におけるCD4 T細胞が認識するXAGE-1b (GAGED2a) OLP領域を示す。下段は、IFN γ ELISAで検出した同患者におけるCD8 T細胞が認識するXAGE-1b (GAGED2a) OLP領域を示す。

以前の検討で, XAGE-1b (GAGED2a) 血清抗体価陽性患者から採取した PBMC より, XAGE-1b (GAGED2a) 抗原特異的 CD4 T 細胞の誘導は可能であった^{29, 30)}. 本研究で抗腫瘍効果をもたらす抗原特異的 CD8 T 細胞の誘導が確認できた事は, この抗原をがん免疫療法の標的抗原と考える上で極めて重要である. すなわち, 核内抗原である XAGE-1b (GAGED2a) を標的とした場合, 細胞傷害活性を示すのは CD8 T 細胞であり, 抗原特異的な CD8 T 細胞の存在が確認できなければ, がん免疫療法による抗腫瘍効果は期待できない. その上で, 抗原の発現特異性, 発現頻度, CD4 T 細胞免疫の強さと CD8 T 細胞の存在を同定した本研究がもたらした意味は大きく, XAGE-1b (GAGED2a) を標的としたがん免疫療法が肺癌において期待される.

今後, さらに症例を増やし, 抗体が認識する領域, CD4 および CD8 T 細胞が認識する領域と最小エピトープの決定, さらに細胞傷害活性を含めた CD4 および CD8 T 細胞による自然エピトープ認識の解析を試み, XAGE-1b (GAGED2a) を標的としたがんワクチン療法を開発する予定である.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始御指導と御校閲を賜りました川崎医療福祉大学 中山睿一教授, ならびに川崎医科大学 呼吸器内科学教室 岡三喜男教授に深甚なる謝意を表します. また, 本研究遂行に多大な御協力頂きました長崎原爆病院 福田実先生, 当科教室員, 研究補助員の皆様に深謝致します. 検体提供を頂いた川崎医科大学 呼吸器外科学教室 中田昌男教授に深く感謝の意を表します. また論文投稿にあたり援助をしていただいた水内純子さんにも心から感謝いたします. 尚, 本研究は科学研究費補助金, 米国がん研究基金および川崎医科大学プロジェクト研究費 (22C-2) の援助によって行われた.

引用文献

- 1) Old LJ, Chen YT: New paths in human cancer serology. *J Exp Med* 187: 1163-1167, 1998
- 2) Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ: Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 615-625, 2005
- 3) Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, *et al.*: Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* 187: 265-270, 1998
- 4) Rosenberg SA: A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10: 281-287, 1999
- 5) Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT: Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188: 22-32, 2002
- 6) Brinkmann U, Vasmatazis G, Lee B, Pastan I: Novel genes in the PAGE and GAGE family of tumor antigens found by homology walking in the dbEST database. *Cancer Res* 59: 1445-1448, 1999
- 7) Brinkmann U, Vasmatazis G, Lee B, Yerushalmi N, Essand M, Pastan I: PAGE-1, an X chromosome-linked GAGE-like gene that is expressed in normal and neoplastic prostate, testis, and uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10757-10762, 1998
- 8) Liu XF, Helman LJ, Yeung C, Bera TK, Lee B, Pastan I: XAGE-1, a new gene that is frequently expressed in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 60: 4752-4755, 2000
- 9) Eglund KA, Kumar V, Duray P, Pastan I: Characterization of overlapping XAGE-1 transcripts encoding a cancer testis antigen expressed in lung, breast, and other types of cancers. *Mol Cancer Ther* 1: 441-450, 2002
- 10) Zendman AJ, van Kraats AA, den Hollander AI, Weidle UH, Ruiter DJ, van Muijen GN: Characterization of XAGE-1b, a short major transcript of cancer/testis-associated gene XAGE-1, induced in melanoma metastasis. *Int J Cancer* 97: 195-204, 2002
- 11) Zendman AJ, Van Kraats AA, Weidle UH, Ruiter DJ, Van Muijen GN: The XAGE family of cancer/testis-associated genes: alignment and expression profile in normal tissues, melanoma lesions and Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* 99: 361-369, 2002
- 12) Ali Eldib AM, Ono T, Shimono M, Kaneko M, Nakagawa K, Tanaka R, Noguchi Y, Nakayama E: Immunoscreeing of a cDNA library from a lung cancer cell line using autologous patient serum: Identification of XAGE-1b as a dominant antigen and its immunogenicity in lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* 108: 558-563,

- 2004
- 13) Sato S, Noguchi Y, Ohara N, *et al.*: Identification of XAGE-1 isoforms: predominant expression of XAGE-1b in testis and tumors. *Cancer Immun* 7: 5, 2007
 - 14) Kikuchi E, Yamazaki K, Nakayama E, Sato S, Uenaka A, Yamada N, Oizumi S, Dosaka-Akita H, Nishimura M: Prolonged survival of patients with lung adenocarcinoma expressing XAGE-1b and HLA class I antigens. *Cancer Immun* 8: 13, 2008
 - 15) R. Murphy, S. Green, G. Ritter, *et al.*: Recombinant NY-ESO-1 cancer antigen: production and purification under cGMP conditions. *Prep Biochem Biotechnol* 35: 119-134, 2005
 - 16) Uenaka A, Wada H, Isobe M, *et al.*: T cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein. *Cancer Immun* 7: 9, 2007
 - 17) Kakimi K, Isobe M, Uenaka A, *et al.*: A phase I study of vaccination with NY-ESO-1f peptide mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *Int J Cancer* 2011 [Epub ahead of print]
 - 18) Nakagawa K, Noguchi Y, Uenaka A, *et al.*: XAGE-1 expression in non-small cell lung cancer and antibody response in patients. *Clin Cancer Res* 11: 5496-5503, 2005
 - 19) Gnjjatic S, Atanackovic D, Jäger E, *et al.*: Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8862-8867, 2003
 - 20) Jäger E, Nagata Y, Gnjjatic S, *et al.*: Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4760-4765, 2000
 - 21) Gnjjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Güre AO, Ritter G, Jäger E, Knuth A, Chen YT, Old LJ: NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv Cancer Res* 95: 1-30, 2006
 - 22) Stockert E, Jäger E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, Arand M, Knuth A, Old LJ: A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* 187: 1349-1354, 1998
 - 23) Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Güre AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ: A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1914-1918, 1997
 - 24) Van den Eynde BJ, van der Bruggen P: T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9: 684-693, 1997
 - 25) Türeci O, Chen YT, Sahin U, Güre AO, Zwick C, Villena C, Tsang S, Seitz G, Old LJ, Pfreundschuh M: Expression of SSX genes in human tumors. *Int J Cancer* 77: 19-23, 1998
 - 26) Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N: A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens: *Cancer Immunol Immunother* 58: 1535-1544, 2009
 - 27) Tsuji T, Matsuzaki J, Ritter E, Miliotto A, Ritter G, Odunsi K, Old LJ, Gnjjatic S: Split T cell tolerance against a self/tumor antigen: spontaneous CD4+ but not CD8+ T cell responses against p53 in cancer patients and healthy donors. *PLoS One* 6: e23651, 2011
 - 28) Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ: Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331: 1565-1570, 2011
 - 29) Morishita Y, Uenaka A, Kaya S, Sato S, Aji T, Nakayama E: HLA-DRB1*0410-restricted recognition of XAGE-1b37-48 peptide by CD4 T cells. *Microbiol Immunol* 51: 755-762, 2007
 - 30) Shimono M, Uenaka A, Noguchi Y, Sato S, Okumura H, Nakagawa K, Kiura K, Tanimoto M, Nakayama E: Identification of DR9-restricted XAGE antigen on lung adenocarcinoma recognized by autologous CD4 T-cells. *Int J Oncol* 30: 835-840, 2007

Antibody, CD4 and CD8 T-cell response against XAGE-1b (GAGED2a) in non-small cell lung cancer patients

Yoshihiro OHUE

Department of Respiratory Medicine, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

ABSTRACT Cancer/testis (CT) antigen is a promising target for cancer vaccine due to their immunogenicity and restricted expression. We previously demonstrated that XAGE-1b (GAGED2a), one of the CT-like antigens, was predominantly expressed in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using XAGE-1b (GAGED2a) mAb (clone USO 9-13). In this study, we investigated humoral and cellular immune responses against XAGE-1b in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC).

Sera and PBMCs were obtained from NSCLC patients who visited Kawasaki Medical School Hospital between 2005 and 2011. Antibody response to XAGE-1b was analyzed by ELISA using synthesized XAGE-1b protein. CD4 and CD8 T-cell responses against XAGE-1b were examined by IFN- γ ELISA and/or capture assay using 17 16- or 17-mer XAGE-1b-overlapping peptides (OLPs) spanning the entire XAGE-1b (GAGED2a) protein by FACS in antibody-positive patients.

Antibody positive frequencies of 362 NSCLC, 220 lung adenocarcinoma and 85 lung squamous cell carcinoma patients were 8.8% (32/362), 12.7% (28/220) and 1.2% (1/85), respectively. In patient KLU187 who is antibody positive, CD4 and CD8 T-cell responses against XAGE-1b (GAGED2a) were observed.

Our findings indicate that CT antigen XAGE-1b (GAGED2a) is highly immunogenic in NSCLC patients inducing antibody, and CD4 and CD8 T-cell responses. XAGE-1b (GAGED2a) is a promising target antigen for immunotherapy against lung adenocarcinoma.

(Accepted on October 24, 2011)

Key words : Cancer/testis (CT) antigen, XAGE-1b (GAGED2a), Non-small cell lung cancer (NSCLC), Cancer immunity

Corresponding author

Yoshihiro Ohue

Department of Respiratory Medicine, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan.

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 464 1041

E-mail : poohsan@med.kawasaki-m.ac.jp